



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ**

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING

**ÚSTAV MATERIÁLOVÝCH VĚD A INŽENÝRSTVÍ**

INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING

**BIOKERAMICKÉ PĚNY NA BÁZI KŘEMÍKEM  
SUBSTITUOVANÝCH FOSFOREČNANŮ VÁPENATÝCH**

SILICON SUBSTITUTED CALCIUM PHOSPHATE BASED BIO CERAMIC SCAFFOLDS

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

BACHELOR'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

Karina Karkuszová

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

Ing. Lenka Novotná, Ph.D.

BRNO 2017

# Zadání bakalářské práce

Ústav: Ústav materiálových věd a inženýrství  
Studentka: **Karina Karkuszová**  
Studijní program: Aplikované vědy v inženýrství  
Studijní obor: Materiálové inženýrství  
Vedoucí práce: **Ing. Lenka Novotná, Ph.D.**  
Akademický rok: 2016/17

Ředitel ústavu Vám v souladu se zákonem č.111/1998 o vysokých školách a se Studijním a zkušebním řádem VUT v Brně určuje následující téma bakalářské práce:

## **Biokeramické pěny na bázi křemíkem substituovaných fosforečnanů vápenatých**

### **Stručná charakteristika problematiky úkolu:**

Synteticky připravený stechiometrický hydroxyapatit je, na rozdíl od hydroxyapatitu obsaženého v tvrdých tkáních, v podmínkách in vivo téměř inertní, nerozpustný a neumožňuje tedy přirozenou remodelaci tkání. Defekty v mřížce naopak vedou k lepší biokompatibilitě, některé prvky (jako např. křemík) navíc podporují buněčnou diferenciaci. Optimální koncentrace křemíku s ohledem na biologické chování a rozpustnost materiálu v těle nebyla doposud jednoznačně stanovena. Chování syntetických náhrad tvrdých tkání v těle kromě složení ovlivňuje mnoho faktorů. Odpověď buněk závisí i na mikro/makro struktuře substrátu, je proto vhodné biologické vlastnosti náhrad trámčité kosti studovat na trojrozměrné keramické pění.

### **Cíle bakalářské práce:**

Sepsat literární rešerši týkající se biokeramických kompozitních materiálů na bázi vápníku, fosforu a křemíku. Experimentálně připravit křemíkem substituované kalcium fosfáty (Si–CaP). Z vybraných Si–CaP prášků připravit keramické pěny a charakterizovat je, zejména pak vliv chemického a fázového složení na biologické vlastnosti (bioaktivita, resorbovatelnost).

### **Seznam doporučené literatury:**

Pietak, A. M., Reid, J. W., Stott, M. J. and Sayer, M. (2007): Silicon substitution in the calcium phosphate bioceramics, *Biomaterials*, roč. 28, č. 28, str. 4023-4032, DOI:10.1016/j.biomaterials.2007.05.003.

Sayer, M. a kol. (2003): Structure and composition of silicon-stabilized tricalcium phosphate, *Biomaterials*, roč. 24, č. 3, str. 369-382, DOI: 10.1016/S0142-9612(02)00327-7.

Ather F. K. a kol. (2014): Bioactive behavior of silicon substituted calcium phosphate based bioceramics for bone regeneration, Materials Science and Engineering: C, roč. 35, str. 245-252, DOI: 10.1016/j.msec.2013.11.013.

Ruys, A. J. (1993) Silicon Doped Hydroxyapatite, J. Aust. Ceram. Soc, roč. 29, č. 1/2, str. 71-80.

Termín odevzdání bakalářské práce je stanoven časovým plánem akademického roku 2016/17

V Brně, dne

L. S.

---

prof. Ing. Ivo Dlouhý, CSc.  
ředitel ústavu

---

doc. Ing. Jaroslav Katolický, Ph.D.  
děkan fakulty

## ABSTRAKT

Teoretická časť bakalárskej práce zhrňuje súčasný stav poznania z oblasti biokeramických materiálov na bázy vápniku, fosforu a kremíku. Konkrétnejšie sa zameriava na kalcium fosfáty, požiadavky na nich kladené, pórovitosť 3D pien a biologické vlastnosti, ako je biodegradácia a bioaktivita. 3D biokeramické kalcium fosfátové peny dopované kremíkom sa javia ako vhodný materiál na použitie v biomedicínskych aplikáciách. Práve kremík zohráva úlohu pri vývoji zdravej kosti a vytváraní nového tkaniva. Kremíkové substitúcie sú v oblasti skúmania dôležité, pretože zlepšujú biologickú odpoveď kalcium fosfátov.

V experimentálnej časti boli najprv pripravené kalcium fosfátové prášky pomocou tuhofázovej reakcie hydroxyapatitu a oxidu kremičitého. Vybrané obsahy práškov boli 0; 0,1; 1, 2,5, 5, 10 a 20 hm.%  $\text{SiO}_2$ . Vzorky boli spekané na teploty 1100 °C, 1200 °C a 1300 °C. Druhá časť pozostávala z prípravy 3D pien priamym penením pomocou polyuretánu a následnou charakteristikou fázového zloženia, rozpustnosti a bioaktivity. Biokeramické peny mali vysoko pórovitú štruktúru. Počas 42 dní bolo sledované správanie vzoriek v Tris-HCl a simulované tělní tekutině (SBF). Výsledky experimentu ukázali, že vzorky sú bioaktívne a substitúcia kremíkom zvyšuje rozpustnosť kalcium fosfátov. Preto majú tieto materiály potenciálne využitie pre biomedicínske aplikácie.

## KLÚČOVÉ SLOVÁ

Biomateriály, Biokeramika, Kalcium Fosfáty, Kremík, Substitúcie, Degradácia, Bioaktivita

## **ABSTRACT**

The theoretical part of this bachelor thesis summarizes the current state of knowledge of bioceramic materials based on calcium, phosphorus and silicon. More specifically, it focuses on calcium phosphates, the demands placed on them, the porosity of 3D foams, and biological properties such as biodegradation and bioactivity. 3D bioceramic calcium phosphate foam doped with silicon appears to be a suitable material for use in biomedical applications. It is the silicon that plays a role in the development of healthy bone and the formation of new tissue. Silicon substitutions are important in the field of investigation because they improve the bioassay of phosphate calcium.

In the experimental part, calcium phosphate powders were first prepared by the hydroxyapatite and silica fusion reaction. Selected powder contents were 0; 0.1; 1, 2.5, 5, 10 and 20 wt.% SiO<sub>2</sub>. The samples were sintered at 1100 °C, 1200 °C and 1300 °C. The second part consisted in the preparation of 3D foams by direct penetration with polyurethane and the subsequent characteristics of phase composition, solubility and bioactivity. Bioceramic foams had a highly porous structure. For 42 days, sample behavior in Tris-HCl and simulated body fluid (SBF) was monitored. The results of the experiment have shown that the samples are bioactive and silicon substitution increases phosphate calcium solubility. Therefore, these materials are potentially useful for biomedical applications

## **KEYWORDS**

Biomaterial, Bioceramic, Calcium Phosphate, Silicon, Substitution, Degradation, Bioactivity

KARKUSZOVÁ, K. Biokeramické peny na báze kremíkom substituovaných fosforečnanov vápenatých. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství. Ústav materiálových věd a inženýrství, 2017. x s., 4 s. příloh. Bakalárska práce. Vedúca práce: Ing. Lenka Novotná, Ph.D.

## **PREHLÁSENIE**

Prehlasujem, že svoju bakalársku prácu na tému Biokeramické peny na báze kremíkom substituovaných fosforečnanov vápenatých som vypracovala samostatne, pod vedením vedúcej bakalárskej práce a s použitím odbornej literatúry a ďalších informačných zdrojov, ktoré sú všetky citované v práci a uvedené v zozname literatúry na konci práce.

V Brně dňa .....

.....

(podpis autora)

## **POĎAKOVANIE**

Ďakujem veľmi pekne vedúcej bakalárskej práce ing. Lenke Novotnej, Ph. D. za účinnú metodickú, pedagogickú, odbornú pomoc, za trpezlivosť a ďalšie cenné rady pri spracovaní bakalárskej práce. Ďalej by som chcela poďakovať Ústavu materiálových vied a inžinierstva a Ceitecu za to, že mi umožnili pracovať na tejto práci.

V Brne dňa .....

.....

(podpis autora)

# OBSAH

<b>1 Úvod</b>	<b>2</b>
Výklad biologických termínov .....	3
<b>2 Teoretická časť</b>	<b>4</b>
Požiadavky kladené na materiály .....	4
Kalcium Fosfáty.....	7
Substituované kalcium fosfáty .....	9
Kalcium fosfáty substituované kremíkom.....	10
<b>3 Cieľ práce</b>	<b>12</b>
<b>4 Experiment</b>	<b>13</b>
Materiál .....	13
Príprava substituovaného prášku .....	13
Príprava vzoriek .....	14
Testovanie rozpustnosti .....	15
Testovanie bioaktivity.....	16
Charakterizácia pien .....	16
Testovanie rozpustnosti v Tris-HCl.....	21
SBF- testovanie bioaktivity .....	23
<b>5 Záver</b>	<b>25</b>
<b>Literatura</b>	<b>26</b>
<b>zoznam skratiek</b>	<b>28</b>
<b>zoznam obrázkov</b>	<b>28</b>
<b>Zoznam tabuliek</b>	<b>29</b>
<b>zoznam rovníc</b>	<b>29</b>



# 1 ÚVOD

Jednou zo zaujímavých a najviac oceňovaných inžinierskych oblastí je vývoj aplikácií na využitie v zdravotnej starostlivosti. Dopyt po syntetických materiáloch, ktoré by boli využiteľné na podporu a nahradenie kostného tkaniva neustále rastie. Veľká časť výskumu sa sústreďuje na zlepšenie pevnosti na rozhraní náhrada-tkanivo a v konštrukcii, ktorá by mala degradovať s prirodzeným procesom hojenia [1]. Avšak, aby boli tieto náhrady prijaté telom, bez žiadnych vedľajších účinkov, musia byť vyrobené zo špeciálnych, telom tolerovaných materiálov. Nazývame ich biomedicínske materiály, v skratke biomateriály. Väčšina dostupných biomateriálov má z fyzikálneho hľadiska pevný charakter [2]. Z materiálového hľadiska delíme pevné látky do štyroch hlavných skupín: kovy, polyméry, keramika a ich rôzne zmesi, nazývané kompozity. Rovnako sa rozdeľujú všetky typy pevných biomateriálov: biokovy, biopolyméry, biokeramika a biokompozity. Všetky z nich zohrávajú dôležitú úlohu v nahradzovaní a regenerácii rôznych ľudských tkanív. Na obnovenie poškodených kostí sa tradične používajú rôzne typy štepov. V neskorších 60-tych rokoch vzrástol záujem o štúdium keramiky ako potenciálneho materiálu na výrobu štepov, kvôli jej chemickým a biomechanickým vlastnostiam. Tá všeobecne zahŕňa polykryštalické látky, amorfné látky (sklá) a ich zmesi (sklokeramika). Avšak prvky, používané na výrobu biokeramiky tvoria len malú časť periodickej tabuľky. Menovite sa používa vápnik, fosfor, kremík, uhlík a ich zlúčeniny, ale aj obmedzené množstvá iných látok. Z oxidov je to oxid hlinitý, oxid zirkoničitý a oxid horečnatý. Využitie týchto prvkov a zlúčenín je hlavne na výrobu materiálov schopných nahradiť alebo podporiť pôvodné ľudské kostné tkanivo. Všetky z týchto náhrad môžu byť vyrábané v hutnej aj pórovitej podobe, taktiež ako prášky, častice, granule alebo povlaky [2]. Ako je vidieť, štúdium biokeramiky je stále pomerne široká oblasť, preto bude táto práca obmedzená len na aplikáciu biokeramiky na báze kalcium fosfátov. Vďaka chemickej podobnosti s ľudskou kosťou a zubami ponúka veľa možností využitia. Za posledných 40 rokov sa v tejto oblasti štúdia zaznamenalo mnoho úspechov. Po základnom vývoji biokeramiky, ktorá bola schválená z fyziologického hľadiska sa teraz dôraz kladie na náhrady, ktoré budú tvoriť priame chemické väzby so susednou kosťou. Náhrady, vyrobené z kalcium fosfátov, ostávajú zo štruktúrneho aj kompozičného hľadiska po zabudovaní do kosti stabilné alebo sa časom vstrebú. Biokeramické peny na báze kalcium fosfátov sú navrhnuté tak, aby vyvolali tvorbu kostí a umožnili vaskularizáciu. Peny sú porézne a tým vhodné na prenos biomolekúl a následné osídlenie bunkami. Perspektívne budúce aplikácie zahŕňajú dodávku liečiv a tkanivové inžinierstvo, pretože kalcium fosfáty sa javia ako sľubný nosič rastových faktorov, bioaktívnych peptidov a rôznych druhov buniek.

## Výklad biologických termínov

Do práce pripájam, krátke vysvetlenie biologických termínov potrebný k lepšiemu porozumeniu BP.

- Augmentácia- rozmnožovanie, zväčšenie, prírastok nových kostných buniek [3].
- Osteointegrácia- hojenie implantátu, priame spojenie medzi kosťou a povrchom implantátu [3].
- Osteogenéza- vznik a vývoj kostnej hmoty [4].
- Vaskularizácia- tvorba nových ciev, prerastanie ciev do kostného tkaniva [3]
- Osteocyt- základná bunka zrelej kosti [4].
- Osteoblast- bunka, ktorá vytvára kostné tkanivo, produkuje základnú medzibunkovú hmotu [4].
- Osteoklast- kostná bunka schopná pohybu, s rozvetveným povrchom a schopnosťou odbúravania kostného tkaniva [4].
- Trabekulárna kosť- hubovitá časť kosti [4].
- Anabolizmus- metabolizmus spojený so syntézou nových organických látok a tvorbou štruktúr.

## 2 TEORETICKÁ ČASŤ

Existuje veľa definícií na význam slova „biomateriál“. Napríklad v 20-tom storočí, bol biomateriál podľa navrhnutého konsenzu definovaný ako syntetický alebo prírodný materiál používaný na náhradu častí živého systému alebo na fungovanie v tesnej blízkosti so živým organizmom [4]. V roku 2009, vylepšená definícia znela: Biomateriál je látka, ktorá bola navrhnutá tak, aby v určitej forme (či už sama alebo ako kompozit) bola použitá priamo, riadením zložkami živého systému, na terapeutické alebo diagnostické procedúry v ľudskej alebo veterinárnej medicíne [5]. Zmeny v definícií boli podmienené koncepciou a očakávaniami, ktoré sa vzájomne časom menili [6]. Vo všeobecnosti je biomateriálová disciplína založená na interakcii medzi materiálovými vedami, biológiou, chémiou, medicínou a mechanikou. To vyžaduje znalosť všetkých oblastí, aby potenciálne implantáty riadne vykonávali svoju funkciu v tele a čo najmenej narúšali jeho normálne funkcie [7]. Cieľom je dosiahnuť správnu biologickú interakciu umelých štepov so živým tkanivom hostiteľa. Aby sa toho dosiahlo, je potrebné prekonať niekoľko etáp vývoja ako materiálová syntéza, dizajn, výroba, následné testovanie.

Čo sa týka biokeramiky, tá je definovaná ako biomateriál, ktorý má keramický pôvod. Keramika je anorganická, nekovová pevná látka, pripravená pôsobením tepla a následným chladením. Keramické materiály môžu mať kryštalickú, čiastočne kryštalickú alebo amorfnú štruktúru. Pretože väčšina bežnej keramiky je kryštalická, definícia sa často obmedzuje na anorganické kryštalické materiály. [8] Biokeramika je dôležitou skupinou pokročilej keramiky, ktorá sa hlavne zaoberá náhradou pevných tkanív v ľudskom tele. Najväčšou výhodou biokeramiky je jej chemická odolnosť, odolnosť proti oteru, nereaktivnosť a to že je pre ľudský organizmus netoxická. [8] Implantácia keramických náhrad dosahuje veľmi dobré výsledky, preto sú tieto materiály široko uplatniteľné v oblastiach ako napríklad hojenie kostných defektov, liečba zlomenín, náhrady kĺbov a augmentácia kostí [9]. Materiál implantátu závisí na požadovaných výsledných vlastnostiach. Prihliada sa najmä na biokompatibilitu, chemické, mechanické a fyzikálne vlastnosti. Výzvou, ktorej čelia medicínske aplikácie je vytvorenie biomateriálu, ktorý bude schopný nahradiť a následne zregenerovať poškodené, zhoršujúce sa kosti, v dôsledku opotrebenia alebo veku, bez toho, aby stratil mechanickú podporu [9].

### Požiadavky kladené na materiály

Vlastnosti keramiky sú zásadne ovplyvnené chemickým zložením, pórovitosťou, obsahom nečistôt a veľkosťou častíc vo vstupnom stave. Podľa schopnosti implantátu reagovať na živé tkanivo sa delia na: bioinertné, bioaktívne, vstrebateľné. Základné požiadavky kladené na biokeramické materiály sú biodegradácia a bioaktivita

#### **Biodegradácia:**

Krátko, po implantácii je liečebný proces zahájený zmenami v usporiadaní okolitých biologických tekutín a adsorpciou biomolekúl. Po tom, čo bunky narazia na povrch biokeramiky na báze kalcium fosfátov, vytvoria adsorbovanú vrstvu. Na jej hĺbke záleží odpoveď náhrady. Potom začína samotná biodegradácia implantovanej kalcium

fosfátovej biokeramiky. Biodegradácia sa môže uskutočňovať tromi spôsobmi [8]:

1. Fyzikálne: v dôsledku oteru
2. Chemicky: fázovou transformáciou, precipitáciou fáz, fyzikálno-chemická rozpustnosť
3. Biologicky: bunkovou aktivitou alebo bioresorpciou

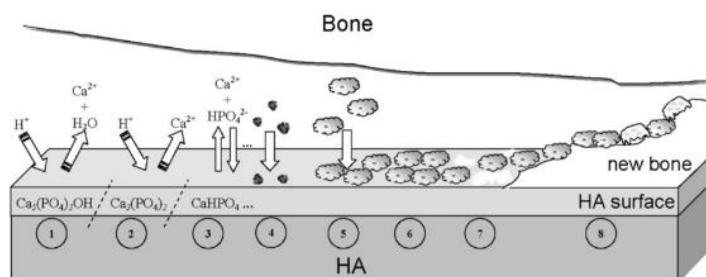
V biologických systémoch prebiehajú tieto procesy súčasne alebo medzi sebou súperia. Odkedy sa kalcium fosfáty rozdeľujú podľa pomeru Ca/P, zásaditosti/ kyslosti a rozpustnosti (vid. Tab. 1), je rýchlosť a mechanizmus degradácie závislý na type kalcium fosfátov [10]. Rozpustnosť je fyzikálno-chemický proces, ktorý je kontrolovaný niekoľkými faktormi ako rozpustnosť kalcium fosfátov, pomer merného povrchu a objemu, miestna kyslosť, prúdenie tekutiny a teplota. Až na niektoré výnimky je rozpustnosť nepriamo úmerná k pomeru Ca/P, fázovej čistote, veľkosti kryštálov a priamo úmerná k pórovitosti a mernému povrchu.

Bioresorpcia je biologický proces sprostredkovaný bunkami. Záleží na reakcii buniek na ich prostredie. Osteoklasty sa pevne pripájajú k implantátu a rozpúšťajú kalcium fosfáty, čo vedie k miestnemu poklesu pH na 4-5. To znamená, že sa častice kalcium fosfátov môžu začleniť do cytoplazmy a byť rozpustené kyselinou alebo inými enzymatickými procesmi. [8]

V každom prípade je *in vivo* degradácia a resorpcia zložitou kombináciou procesov vyskytujúcich sa súčasne alebo vo vzájomnej konkurencii. Procesy, ktoré sa dejú *in vitro* sa nutne nemusia týkať *in vivo* procesov a naopak. Zvyčajne sa *in vitro* degradácia kalcium fosfátov simuluje rozkladaním materiálu v mierne kyslej tekutine a sledovaním uvoľňovania iónov za určitý čas [11]. Kyslá tekutina do určitej miery napodobňuje kyslé prostredie v priebehu aktivity osteoklastov.

### **Bioaktivita**

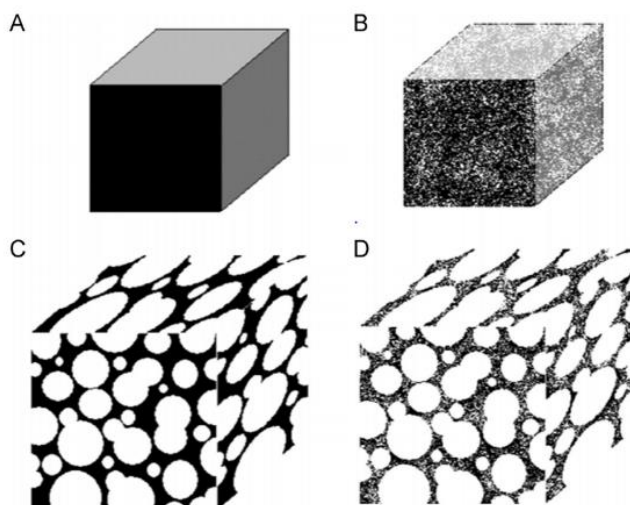
Všeobecne platí, že bioaktívne materiály interagujú s okolitou kosťou, čo vedie k tvorbe chemických väzieb k tomuto tkanivu. Tento jav je podmienený chemickými faktormi, ako kryštalová fáza, molekulárna štruktúra biomateriálu a fyzikálnymi faktormi, ako drsnosť povrchu, porozita. V *in vivo*, bunkovej aktivite v kyslom prostredí bolo pozorované, že za následok čiastočného rozpustenia kalcium fosfátov môže uvoľňovanie vápniku a iónov do prostredia. Voľné ióny zvyšujú stupeň nasýtenia okolitej telovej tekutiny, čo spôsobuje zrážanie najdrobnejších kryštálov biologického apatitu s rôznymi iónmi v tekutine. Spájací mechanizmus s povrchom náhrad je popísaný v 8 krokoch na obr. 1. Prvý krok znázorňuje začiatok procesu, kedy začína rozpúšťanie HA na povrchu. Pokračuje ďalším rozpúšťaním a následným vznikom rovnovážneho stavu medzi fyziologickým roztokom a modifikovaným povrchom HA. Štvrtým krokom je adsorpcia proteínov a iných bioorganických zložiek, ďalej bunková adhézia a množenie buniek. Postupne sa začína vytvárať nové kostné tkanivo a formuje sa nová kosť. Prvé 4 kroky sú chemické reakcie na povrchu HA. Zvyšné kroky sú biologické procesy, pretože medzi nich patrí aktivita osteoblastov, diferenciácia buniek na tvorenie nového kostného tkaniva, ktorá tvorí silnú väzbu s povrchom implantátu. Preto sa hranica medzi štvrtým a piatym krokom určuje ako prechod medzi neživou a živou fázou. V roku 2010 bola navrhnutá nová hypotéza (vid' obr. 1), ktorá popisuje povrchové transformácie, ktoré sa dejú s kalcium fosfátovou keramikou (v tomto prípade HA) krátko po implantácii [12].



Obr. 1. Schematický náčrt procesov prebiehajúcich na povrchu hydroxyapatite (HA) po implantácii [8]

### Pórovitosť

Pórovitosť je definovaná ako percento dutín v pevnej látke. Merný povrch poréznych telies je oveľa väčší ako u hutných materiálov, čo poskytuje miesto na ich povrchu, kde sa jednoduchšie vytvorí chemická väzba medzi biokeramikou a kosťou [13]. Porézny materiál môže mať uzavreté (izolované) a otvorené (prepojené) póry. To si môžeme predstaviť ako sústavu kanálov, prístupných pre plyny, kvapaliny a bunky [14]. Práve charakter materiálu s otvorenými pórmi je jedinečnou a nevyhnutnou vlastnosťou v mnohých aplikáciách. Okrem toho sú veľmi dôležité aj rozmery a geometria pórov.

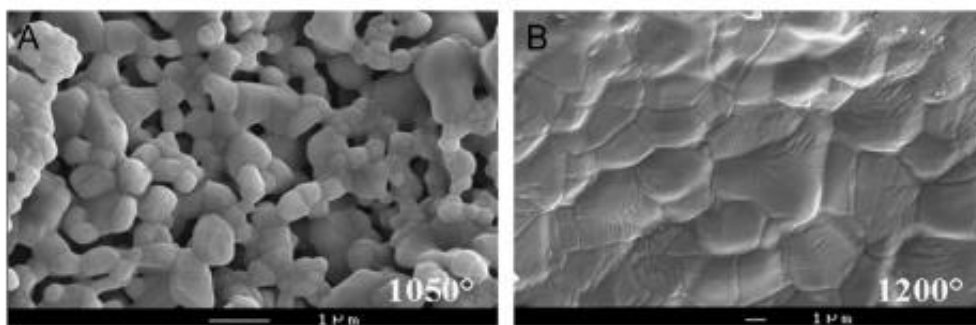


Obr. 2. Schématické nákresy rôznych typov pórovitosti keramických materiálov. A- neporézny, B- mikropórovitosť, C- makropórovitosť (sférická), D- makropórovitosť (sférická) + mikropóry, D- makropórovitosť (3D-tlač) [8].

Pórovitosť a veľkosť pórov, na makroskopickú a mikroskopickú úroveň je dôležitá z hľadiska morfológických vlastností biomateriálov a schopnosti ich regenerácie. Kostné tkanivo má širokú škálu funkcií, preto nie je možné navrhnuť presný objem a veľkosť pórov, ktorý by zahŕňal všetky vlastnosti optimálne pre kostné tkanivo. Vysoká pórovitosť zlepšuje schopnosť vrastania a osteointegráciu po implantácii. Avšak scaffoldy vyrobené z biomateriálov s vysokou schopnosťou degradácie by nemali mať vysokú pórovitosť ( $\geq 90\%$ ) aby sa nerozpustili ešte pred substitúciou novovytvorenej kosti. Na druhej strane, scaffoldy s nízkou schopnosťou degradácie a dostatočnou pevnosťou, môžu byť vysoko porézne. Ich povrch je vďaka pórmi väčší, čo pomáha

urýchliť interakciu buniek s hostiteľským tkanivom. Pórovitosť u biomateriálov delíme na mikro ( $<10\mu\text{m}$ ) a makro ( $>50\mu\text{m}$ ) pórovitosť [15]. Minimálna odporúčaná veľkosť pórov je  $100\mu\text{m}$  [16]. Následné štúdie ukázali že lepšiu osteogenézu majú náhrady s pórmí  $\geq 300\mu\text{m}$  [17], pretože uprednostňujú priamu osteogenézu a tým umožňujú vaskularizáciu. Na obr. 2 sú zobrazené nákresy rôznych druhov pórovitosti. Na obr. 2 A je neporézna štruktúra a obr. 2 D je kombináciou mikro a makro pórovitosti. [8].

Pórovitosť po slinutí (póry veľkosti menej ako  $10\mu\text{m}$ ), viz Obr. 2 B,D je definovaná jej objemom, ktorý môže obsiahnuť biologickú tekutinu a to len v prípade otvorených pórov [18]. Veľkosť pórov závisí na zložení materiálu a tepelnom cykle spekania. Mikropórovitosť poskytuje väčší merný povrch pre adsorpciu proteínov a zvýšenie iónovej rozpustnosti. Zvyčajne, čím vyššia je spekacia teplota, tým nižší je obsah pórov a merného povrchu biokeramiky. Napríklad, výsledkom spekania HA biokeramiky na  $1200^\circ\text{C}$  je menšia mikropórovitosť a dramatické zmeny vo veľkosti zrn, v porovnaní so spekaním na  $1050^\circ\text{C}$ , ako vidieť na obr. 3 [19].



Obr. 3. SEM fotografie kalcium fosfátovej biokeramiky zlinutej na A-  $1500^\circ\text{C}$  a B-  $1200^\circ\text{C}$  [8].

Štúdie ukázali, že pokiaľ ide o biomedicínsky význam pórovitosti, môže zvýšenie merného povrchu a počtu pórov urýchliť tvorbu apatitu *in vivo*. Preto dôležitú úlohu zohráva kontrola nad pórovitosťou, rozmermi a vnútornou stavbou pórov biokeramik. Je to dôležité pre pochopenie vzťahu medzi bioaktivitou a štruktúrou a k vytvoreniu nového, lepšieho dizajnu biokeramik, na tvorbu kosti [20]. Bohužiaľ pórovitosť výrazne znižuje pevnosť implantátov [21]. Preto takýto materiál nemôže byť zaťažovaný, takže sa používa len na výplň malých kostných defektov. Implantát, ako celok, sa stáva pevnejším, keď do neho vrastie nové tkanivo, tým ho integruje a následne pretvorí [22].

## Kalcium Fosfáty

V roku 2010, bol celkový predaj kostných štepov len v USA ocenený na 1,3 miliárd dolárov, s vyhlídkou 2,3 miliardy do roku 2017 [8]. To ukazuje, aký vysoký dôraz sa kladie na výskum takého syntetického materiálu, ktorý by bol schopný nahradiť kostné tkanivo. Ako najlepšie riešenie sa javia práve kalcium fosfáty. V tab. č. 1 sa nachádza široká škála dostupných komerčných kalcium fosfátov, vrátane ich chemického vzorca, rozpustnosti, pomeru Ca/P a pH [23]. Najštudovanejšou oblasťou sú kalcium fosfáty. Medzi najpoužívanejšie patrí Hydroxyapatit (HA),  $\alpha$  a  $\beta$  Trikalcium fosfát ( $\alpha$ -TCP,  $\beta$ -TCP). Molárny pomer vápniku a fosforu u TCP je 1,5 a u HA je to 1,67. Až na niektoré

výnimky je biokeramika pripravovaná z nedopovaného kalcium fosfátu.

Vzájomne je možné keramiku odlišiť podľa viacerých hľadísk, ako chemická štruktúra (vrátane stechiometrie a čistoty), homogenita, fázová distribúcia, morfológia veľkosť a tvar zŕn, hranice zŕn, veľkosť kryštálov, póry, trhliny, povrchová drsnosť, atď. Z chemického hľadiska je prevažná väčšina kalcium fosfátovej biokeramiky založená na hydroxyapatite HA, dvoch typoch trikalciumfosfátach ( $\alpha$ -TCP a  $\beta$ -TCP) a rôznych viacfázových zlozeniach [62]. Dvojfázové kalcium fosfáty, v skratke BCP (biphasic calcium phosphate) sú jednými z najjednoduchších a zahrňujú  $\beta$ -TCP+HA,  $\alpha$ -TCP+HA alebo dvojfázový TCP, zložený z  $\alpha$ -TCP a  $\beta$ -TCP. Oproti ostatným majú tieto kalcium fosfáty vyššiu rozpustnosť ( $HA > \beta$ -TCP  $> \alpha$ -TCP), to dáva týmto kalcium fosfátom väčší potenciál na osteointegráciu implantátu. Okrem dvojfázových sa používajú aj trojfázové kalcium fosfáty zložené z HA+ $\alpha$ -TCP+ $\beta$ -TCP [25]. HA je na rozdiel od  $\alpha$ - a  $\beta$ -TCP stabilnejší z fyziologického hľadiska, pretože má nižšiu rozpustnosť (tab. 1) a tým sa pomalšie vstrebáva [26]. Preto je koncept BCP podmienený nájdením optimálnej rovnováhy medzi stabilnejším HA a rozpustnejším TCP. Vzhľadom k vyššej biologickej rozložiteľnosti sa reaktivita BCP sa zvyšuje sa rastúcim pomerom TCP/ HA. Preto, môže byť biorozpustnosť *in vivo* v BCP kontrolovaná pomocou fázového zloženia [27]. Rovnaké závery platia pre dvojfázové TCP (kde  $\alpha$ -TCP je rozpustnejší), pre trojfázové a zložitejšie formulácie [28].

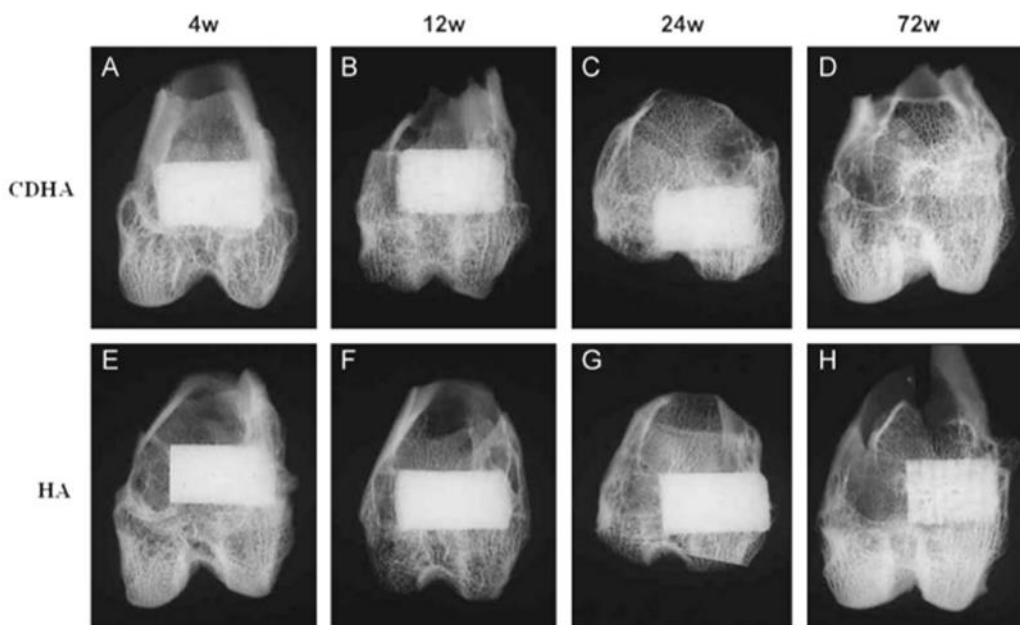
Tab. č. 1.: Zoznam komerčne dostupných kalcium fosfátov. Prevzaté z [8].

Ca/P molárny pomer	Názov zlúčeniny + Skratka	Chemický vzorec	rozpustnosť pri 25°C, log (Ks)	rozpustnosť pri 25°C, g/L	pH pri 25°C
0,5	Monokalcium fosfát monohydrát (MCPM)	$Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$	1,14	$\approx 18$	0,0- 2,0
0,5	Monokalcium fosfát bezvodý (MCPA / MCP)	$Ca(H_2PO_4)_2$	1,14	-17	c
1,0	Dikalcium fosfát dihydrát (DCPD), minerálny brushite	$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$	6,59	-0,088	2,0- 6,0
1,0	Dikalcium fosfát dihydrát (DCPD / DCP), mineral monetite	$CaHPO_4$	6,90	-0,048	c
1,33	Oktakalcium fosfát (OCP)	$Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4 \cdot 5H_2O$	96,6	$\approx 0,0081$	5,5-7
1,5	$\alpha$ -Trikalcium fosfát ( $\alpha$ -TCP)	$\alpha$ - $Ca_3(PO_4)_2$	25,5	-0,0025	a
1,5	$\beta$ -Trikalcium fosfát ( $\beta$ -TCP)	$\beta$ - $Ca_3(PO_4)_2$	28,9	$\approx 0,0005$	a
1,2-2,2	Amorfný kalcium fosfát (ACP)	$Ca_xH_y(PO_4)_z \cdot nH_2O$	b	b	$\approx 5$ - 12 <sup>d</sup>
1,5-1,67	Vápnikom ochudobnený hydroxyapatit (CDHA / Ca-def HA) <sup>e</sup>	$Ca_{10-x}(HPO_4)_x(PO_4)_{6-x}$ $x(OH)_{2-x(0 \leq x \leq 1)}$	85	$\approx 0,0094$	6,5- 9,5 9,5-
1,67	Hydroxyapatit (HA, HAp / OHAp)	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	116,8	-0,0003	12
1,67	Fluorapatit (FA / FAp)	$Ca_{10}(PO_4)_6F_2$	120,0	$\approx 0,0002$	7-12
1,67	Oxyapatit (OA, OAp or OXA) <sup>f</sup>	$Ca_{10}(PO_4)_6O$	-69	-0,087	a
2,0	Tetrakalcium fosfát (TTCP or TetCP)	$Ca_4(PO_4)_2O$	38-44	-0,0007	a

a- tieto zlúčeniny nemôžu byť vyzrážané z vodných roztokov  
b- nemožno presne zmerať, boli zistené tieto hodnoty 25,7  $\pm$  0,1 (PH1 / 47.40), 29,9  $\pm$  0,1 (PH1 / 46.00), 32,7  $\pm$  0,1 (PH1 / 45.28)  
c- stabilné pri teplotách nad 100°C  
d- vždy metastabilné  
e- niekedy nazývané precipitovaný HA (PHA)

## Substituované kalcium fosfáty

Kostné tkanivo je kompozit pozostávajúci z buniek, zabudovaných v anorganickej matrici. Kostný minerál má štruktúru a chemické zloženie podobné hydroxyapatitu (HA,  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ) [29]. Vďaka tejto podobnosti je syntetický stechiometrický HA rozsiahlo používaný ako náhradný kostný materiál. Z dlhodobého hľadiska môže implantát zlyhať, pretože je bioinertný a na rozhraní sa nerozpúšťa [30]. Na rozdiel od toho, minerál nájdený v kostiach nie je stechiometrickou zlúčeninou. Vykazuje významné rozdiely v množstvách vápniku, fosforu a hydroxidovej skupiny [29]. V kostných mineráloch sa nachádzajú rôzne prvky, ktoré substituovali do matrice až do množstva 8 hm%. Prvky ako sodík, horčík, draslík, stroncium, zinok, bárium, meď, hliník, železo, fluór, chlór a kremík sú stopovými prvkami a ich množstvo nepresahuje 1 hm% [31]. Molárny pomer vápnik/fosfor (0,5) nájdený v kostiach je nepatrne odlišný od pomeru čistého HA (1,67) [32]. To je spôsobené iónovou substitúciou vápniku a fosforu v matrici s množstvom iných atómov a malých molekúl, ako horčík a stroncium pre  $\text{Ca}^{2+}$  [33]. Substitúcie nájdené v zdravých kostiach sú uhlík (0,79 mol/g), sodík (0,32mol/g) a horčík (0,17mol/g) [34]. Iónové substitúcie sú variabilné, kvôli relatívnej nestabilite HA ako minerálu a veľkej povrchovej oblasti kryštálu, ktorá je v kontakte s extracelulárnou tekutinou [34]. Malý stupeň iónovej substitúcie kremíkom a inými prvkami ukázal, že majú značný efekt na termálnu stabilitu, rozpustnosť, osteoklastickú a osteoblastickú odpoveď aj in vitro aj in vivo [35]. Substitúcie zohrávajú dôležitú úlohu v štruktúre apatitu, vzhľadom na biologickú aktivitu v kostných mineráloch a náhradách na báze CaP. Substitúcie tiež ovplyvňujú rozpustnosť, povrchovú chémiu a morfológiu minerálu. Na obr. č. 4 je znázornená rozpustnosť HA po implantácii do kostného tkaniva. U vzorky ochudobnenej o vápnik sa HA rozpúšťal rýchlejšie ako u čistého HA, čo potvrdzuje výhody použitia dopovaného alebo inak upraveného HA v biomedicíne.



Obr. 4. Röntgenové snímky zajačej kosti po implantácii CDHA po A- 4týždňoch, B- 12



týždňoch, C- 24 týždňoch a D- 72 týždňoch a po implantácii HA po A- 4týždňoch, B- 12 týždňoch, C- 24 týždňoch a D- 72 týždňoch [8].

## **Kalcium fosfáty substituované kremíkom**

Kremíkom substituovaný HA je pravdepodobne najviac študovanou skupinou týchto povlakových materiálov a je vhodný pre vysokoteplotné spracovanie a používaný k vytváraniu protéz.

Kremík je považovaný, za nevyhnutný prvok pre normálny vývoj kostí podľa Carlisla [36] a Schwarza [37], pričom nedostatok kremíku má za následok abnormálny vzhľad kostí a chrupaviek. Carlisle preukázal, že mláďatá kŕmené potravou s vyšším obsahom kremíku nad 28 µg/ml vo forme kremičitanov mali lepšiu rast kostí, zvýšené množstvo kĺbových chrupaviek, vyšší obsah kostnej vody a biochemické zmeny v obsahu kostných minerálov [37]. Elektrónová analýza mikrosondou ukázala, že kremík je sústredený do rastových oblastí vyvíjajúcej sa kosti- ako je napr. epifýza [28,29]- miesto s najväčšou osteoblastickou aktivitou.

Výskum, ktorý posudzoval diétu u pacienta ukázal, že zvýšenie obsahu kremíku v potrave u človeka je spojené so zvýšením hustoty kostného minerálu (BMD) v kortikálnej bedrovej kosti u všetkých subjektov, s výnimkou žien po menopauze [38]. Veľké rozdiely v bedrovej BMD (až do 10%) medzi najvyšším(-40mg za deň) a najnižším (14mg za deň) prísunom v potrave pozorovaných skupín poskytli užitočné dáta o koncentrácii biologicky dostupného kremíku, ktorý fyziologicky stimuluje rast kostí. Zaujímavé je, že zatiaľ čo kortikálne kosti boli do značnej miery ovplyvnené kremíkom, trabekulárne kosti boli menej zasiahnuté, aj napriek tomu, že sú vnímané ako metabolicky citlivejšie, vďaka rýchlejšej obnove. Úloha kremíku ako usporiadateľa kostného anabolizmu je podporovaná viac, ako urýchľovača osteoblastickej resorpcie [38]

Príkladom je stopový prvok kremík, ktorý ovplyvňuje reakcie organizmu na materiál náhrad. [39]. Má tiež efekt na kryštalografickú štruktúru, mechanické a chemické vlastnosti [40]. Kremík je dôležitý pre zdravý rast a vývoj kostí a chrupaviek. Syntetické materiály na báze CaP, ktoré obsahujú Si v štruktúre, vykazujú výrazné zvýšenie biologickej aktivity v porovnaní so stechiometrickým zložením [8]. Toto zvýšenie biologickej aktivity je pripisované tomu, že kremík podmieňuje zmeny vlastností materiálov a tiež ovplyvňuje fyziologické procesy v kosti a tkanivách. Prebytok kremíku v materiály nevedí, o čom svedčí tvorba bioskla popísaná v nasledujúcej kapitole.

## **Bioaktívne sklá**

Ďalším zaujímavým materiálom pre použitie v biomedicíne sú bioskla, ktoré sú takmer z polovice tvorené oxidom kremičitým. Oxid kremičitý má tendenciu vytvárať sklené fázy, ktoré podporujú upevnenie, rozmnožovanie a tvorenie nových osteoblastov, čo vedie k začleneniu bioskla do uzdravujúcich kostí [41].. Od objavu Hencha z roku 1960, ktorý tvrdil, že určité sklenené štruktúry môžu formovať silné chemické väzby na kosť (komplexne preskúmané Henchom [41] a Jonesom [42] sa výskum zameriava na vlastnosti týchto materiálov, ktoré sú zodpovedné za ich biokompatibilitu [42]. 45S5 Biosklo,

Biosklo zahŕňa oboje, extracelulárny a intercelulárny efekt na rozhraní medzi náhradou a host'ovským tkanivom. Bolo popísané 12 reakčných stupňov na regeneráciu kosti biosklom, ktoré začínajú implantáciou bioskelným scaffoldom do kostného defektu. Stupne 1-5 sa skladajú z rýchleho uvoľnenia kyseliny kremičitej a iných rozpustných iónových druhov do medzifázového rozhrania do 24 hodín po implantácii. Ako sa kyselina kremičitá zhromažďuje s rastúcou koncentráciou okolo povrchu implantátu, polymerizuje do väčších polymerných kremíkových kyselín. Končí sa vyzrážaním z roztoku za vzniku hydratovaného silikagélu [41]. Súčasne, ióny  $\text{Ca}$ ,  $\text{PO}_4$  a  $\text{CO}_3$  sú absorbované z roztoku na povrch implantátu a kryštalizujú do HA ložísk. [43].

### **3 CIEĽ PRÁCE**

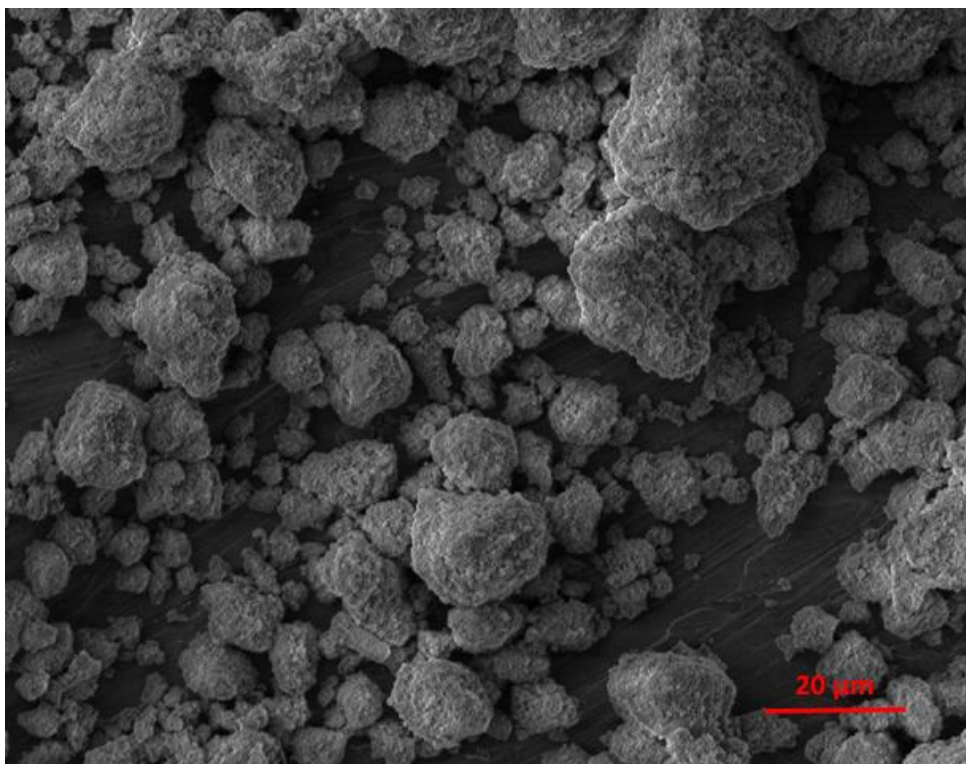
- ❖ Pripraviť kremíkom substituované CaP prášky
- ❖ Z pripravených CaP práškov vytvoriť 3D peny
- ❖ Charakterizovať peny
- ❖ Testovať rozpustnosti
- ❖ Testovať bioaktivitu

## 4 EXPERIMENT

### Materiál

Hydroxyapatit p.a.-  $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$  (n. 21223, Fluka, Švajčiarsko), merný povrch  $33,8 \text{ m}^2/\text{g}$ , priemerná veľkosť aglomerátov v prášku stanovená laserovou difrakciou na približne  $10 \mu\text{m}$ . Röntgenová analýza ukázala že Hydroxyapatit nebol fázovo čistý, cca 10 % tvorených monetitom- hydrogen fosforečnan vápenatý  $\text{CaHPO}_4$ . Ludox SK-R (Grace, USA) je koloidný roztok kremíku, výrobcom udávaná priemerná veľkosť zrn je  $12 \text{ nm}$ , merný povrch  $230 \text{ m}^2/\text{g}$ , s hodnotou pH 7. Ongronat® 2500 MDI (BorsodChem Zrt., Maďarsko). MDI je aromatický izokyanatán, obsahujúci 30,5 % NCO.

Polyol Stepanpol PS-2412 (Stepan Company, USA) je modifikovaný aromatický polyesterový polyalkohol určený na tvorbu tuhých pien.



Obr. 5. Obr. č.: Snímka zrn Hydroxyapatitu. Priemerná veľkosť aglomerátov sa pohybuje v rozmedzí  $8\text{--}13 \mu\text{m}$ .

### Príprava substituovaného prášku

Tuhofázovou reakciou boli z komerčného hydroxyapatitu a oxidu kremičitého Ludox SK-R pripravené kremíkom substituované kalcium fosfáty. Celkové množstvo

pridaného kremíku bolo v rozmedzí 0 ~ 5 hm.%. V práci bude ďalej uvádzané množstvo vzhľadom k SiO<sub>2</sub>, pretože kremík bol pridávaný vo forme koloidného roztoku oxidu kremičitého. Konkrétne boli pripravené prášky, ktoré obsahovali 0; 0,1; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 hm% SiO<sub>2</sub>. Presný obsah oxidu kremičitého v Ludoxe bol stanovený gravimetriou. Test spočíval v zmeraní hmotnostného úbytku po vysušení roztoku a žíhaní pri teplote 600 °C. Obsah bol stanovený na 25 hm.% SiO<sub>2</sub>, z ktorého boli následne vypočítané navážky. Komerčný HA bol spolu s SiO<sub>2</sub> a vodou mletý v planétovom mlyne, v mlecích miskách s polyamidovou vložkou. Ako mlecie elementy boli použité guľičky z ytriom stabilizovaného oxidu zirkoničitého (v pomere 5:1 k hmotnosti prášku) Kvôli vysokej mleckej rýchlosti bol zvolený kratší čas mletia (30 minút), aby nedošlo ku kontaminácii prášku v dôsledku oteru z mlecích guľičiek.. Výsledná suspenzia, bola vysušená v sušiarňi pri teplote 60 °C po dobu 48 hodín. Čas drvenia prášku bol rovnaký približne 4 - 5 minút. Nasledovalo žíhanie v peci na teplote 600 °C po dobu 2 hodín.

## Príprava vzoriek

Na experimenty boli pripravené dva typy vzoriek. Prvým typom boli pevné disky a druhým, pórovité biokeramické 3D peny. Disky boli pripravené nasledovne. Pripravené prášky o rôznom zložení SiO<sub>2</sub> (cca 0,5 g) boli zlisované na jednoosom lise, prítlačnou silou do 10 kN, v kovovej forme s priemerom 12 mm. Prítlačná sila bola volená tak, aby sa vzorky pri vysokom tlaku neprelisovali a následne neštíepili. Konkrétne spekacie teploty boli 1100 °C, 1200 °C a 1300 °C s použitím teplotného cyklu naznačeného na Obr. 5. Cyklus bol volený vzhľadom k spekaniu pien, tak aby u oboch typov vzoriek ostal rovnaký. Zahrievanie prebiehalo najprv menšou rýchlosťou 1 °C/min do teploty 700 °C, nasledoval rýchlejší ohrev (5 °C/min) na danú spekáciu teplotu a výdrž 3 hodiny. Chladenie do 500 °C prebiehalo rýchlosťou 5 °C/min. Teplotný cyklus pri 1300 °C bol rovnaký ako pri 1100 °C, za ktorým nasledoval ohrev rýchlosťou 5 °C/min v superkantalovej peci na 1300 °C, s výdržou 2 hodiny a chladením 5 °C/min.

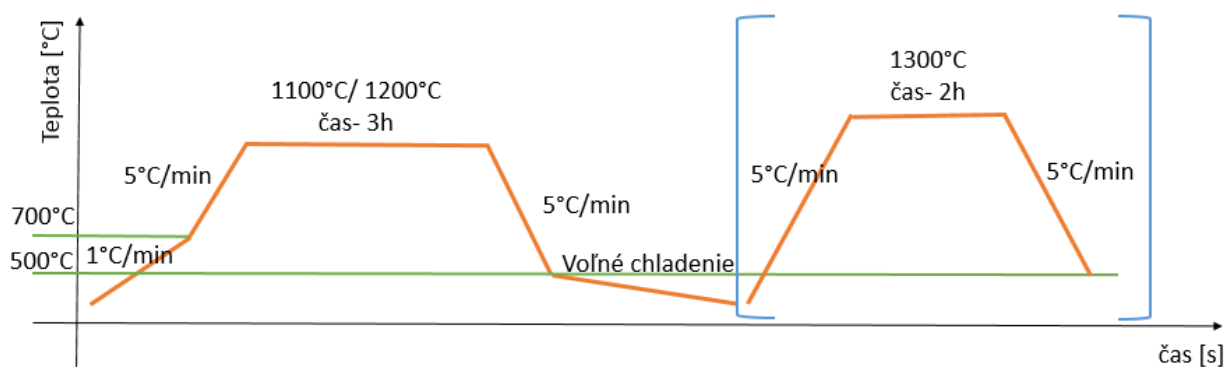
Druhým typom vzoriek boli biokeramické peny. Peny boli pripravené metódou priameho penenia, za použitia polyuretánového systému. Na základe predchádzajúcich experimentov bolo množstvo prášku k zložkám polyuretánu zvolené 1:1. Aby boli póry dostatočne veľké, boli do zmesi pridané 3 hm.% vody. Množstvá jednotlivých zložiek na prípravu pien boli vypočítané na základe nasledujúcej rovnice [1] tak, aby bol izokyanátový index 1,05 (t.j. 5 %-ný prebytok NCO-skupín v sústave).

$$m(\text{iso})n_{\text{eq}}(\text{iso}) = [m(\text{H}_2\text{O}) n_{\text{eq}}(\text{H}_2\text{O}) + m(\text{poly}) n_{\text{eq}}(\text{poly})]i_{\text{NCO}} \quad (1)$$

$m(\text{iso})$ ,  $m(\text{H}_2\text{O})$ ,  $m(\text{poly})$  – množstvo polyizokyanatánu, vody a polyalkoholu

$n_{\text{eq}}(\text{iso})$ ,  $n_{\text{eq}}(\text{H}_2\text{O})$ ,  $n_{\text{eq}}(\text{poly})$  – ekvivalenčné čísla polyizokyanatánu, vody a polyalkoholu

Kremíkom substituovaný kalcium fosfátový prášok (Si-CaP) bol zmiešaný s polyalkoholom Stepanpol a vodou (3 hm.% vzhľadom k polyalkoholu), kým sa nevytvorila homogénna zmes. Do zmesi bol následne pridaný diizokyanatán Ongronat. Po rýchlom zmiešaní, ktoré nesmelo presiahnuť 30 s bola zmes plnená do polyetylénových valcových formičiek. Doba vytvrdnutia zmesi bola 24 hodín. Po vytvrdnutí bol zo vzoriek odstránený polyetylénový obal a z valcových pien boli narezané približne rovnaké pláty hrubé cca 7 mm. Konkrétne spekacie teploty boli 1100 °C, 1200 °C a 1300 °C s teplotným cyklom zobrazeným na obr. 5. Cyklus bol zvolený špeciálne kvôli penovým vzorkám. Pomalá rýchlosť ohrevu zabezpečila postupné vyhorenie všetkej organickej hmoty bez poškodenia štruktúry. Priebeh cyklu bol rovnaký ako pre diskové vzorky, spomenuté v predchádzajúcom odstavci.



Obr. 6. Náčrt teplotného cyklu pri spekaní vzoriek.

Vzorky boli zaliate do dvojzložkovej epoxidovej živice (SpeciFix 20, Struers, Dánsko) za znoženého tlaku v zariadení EpoVac (Struers, Dánsko). Biokeramické peny boli brúsené s menšou prítláčnou silou, pretože sa zrná vydrobujú a tým môžu poškodiť povrch celej vzorky. Opatrením je tiež kratší čas brúsenia a častejšie premývanie brusného kotúča. Použité brusné kotúče mali zrnitosť 9, 3 a 1  $\mu\text{m}$ . Pri všetkých typoch kotúčov bola použitá prítláčná sila 10N a rýchlosť otáčok 200 ot/min. V prípade kotúča 9  $\mu\text{m}$  sa vzorky brúsili 2 krát po 5 minútach. Pri kotúčoch 3  $\mu\text{m}$  a 1  $\mu\text{m}$  bola doba brúsenia kratšia a to 3 minúty.

## Testovanie rozpustnosti

Rozpustnosť bola testovaná podľa normy ISO 10993-14 v roztoku Tris-HCl [1]. Ide o roztok Tris(hydroxymetyl) aminometánu (triviálny názov Tris) rozpusteného vo vode. 0,1M zásaditý roztok bol pripravený z 12,114 g Tris, ktorého pH bolo upravené kyselinou chlorovodíkovou na hodnotu odpovedajúcu pH ľudského tela. Výsledné pH 7,4 pri teplote 37°C sa dosiahlo pridaním 48 ml 1M HCl.

V TRIS pufri boli testované oba typy vzoriek. Disky aj peny boli vložené do 12-jamkovej kultivačnej dosky, každý zvlášť, a zaliate TRIS pufrom.. Na 1g vzorky bolo použitých 6ml TRIS pufru s výmenou každé 3 dni po dobu 28 dní. Potom bol pomer hmotnosti vzorky k objemu pufru zvýšený na 20 ml na 1g vzorky a viac nemenený.

Inkubácia prebiehala v trepacom inkubátore Biosan ES20 pri 120 ot./min pri 37°C. Pred vážením bolo potrebné vzorky dôkladne opláchnuť deionizovanou vodou a nechať ich vysušiť v sušiarňi na konštantnú hmotnosť (aspoň na 3 hodiny pri teplote 150°C). Vzorky boli vážené po 1, 4, 10, 16, 22, 28 a 42 dňoch.

## Testovanie bioaktivity

Simulovaná telová tekutina bola pripravená presne podľa návodu, popísaného Kokubom [44]. SBF bola pripravená postupným rozpustením prísad podľa návodu v určenom poradí. V priebehu pridávania Trisu bolo pH tekutiny udržiavané tak, aby nepresiahlo hodnotu pH 7,45 pri 36,5 °C. Výsledné pH 7,4 bolo dosiahnuté striedavým pridávaním 1M HCl a Tris až do vyčerpania naváženého množstva, s tým, že hodnota pH bola v intervale od 7,4 – 7,45.

V SBF boli testované biokeramické peny. Každá vzorka bola vložená zvlášť do 24-jamkovej kultivačnej misky a zaliata množstvom SBF v pomere 10:1 hmotnosti vzorky. Inkubácia prebiehala v inkubátore pri teplote 37 °C. SBF nebola počas experimentu menená. Celková inkubačná doba bola 2 týždne, následne boli vzorky dôkladne premyté vodou a vysušené v sušiarňi na konštantnú hmotnosť (aspoň 3 hodiny na 150 °C).

## Charakterizácia pien

### 1) Fázové zloženie

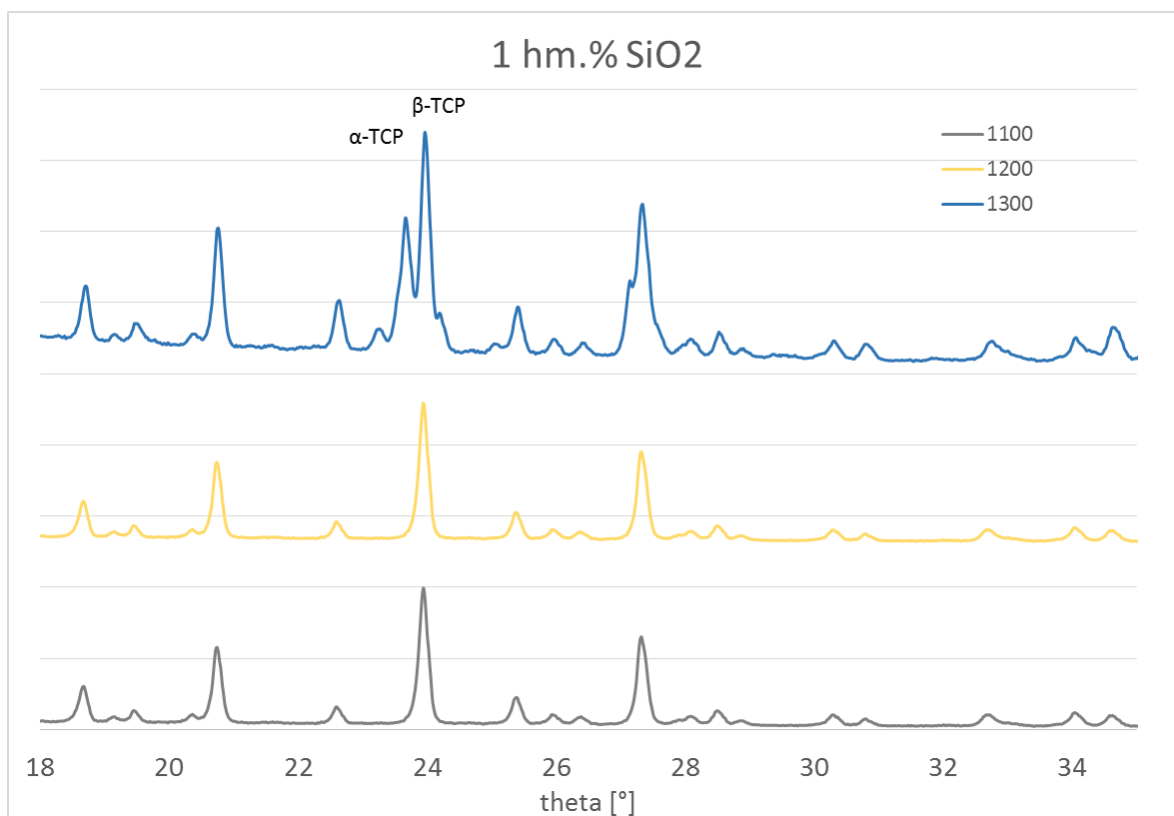
Fázové zloženie u jednotlivých vzoriek bolo stanovené RTG difrakciou na zariadení Rigaku SmartLab 3 kW a Rigaku Miniflex 600. Použitá bola divergenčná clona 0,625° a K-β filter 0,03. Vyhodnotenie prebehlo Rietveldovou analýzou v programe PDXL 2. Vzorky boli merané bez vnútorného štandardu. Makroštruktúra pien bola študovaná pomocou stereolupy Zeiss Stemi 508. Makroštruktúra pomocou skenovacej elektrónovej mikroskopie (Tescan Lyra).

RTG analýza určila fázy, ktoré sa nachádzajú v kalcium fosfátoch spekaných na rôzne teploty. Sú to HA, β-TCP, α-TCP a iné fázy. Z výsledkov RTG difrakcie (viz. Tab. 2) je možné pozorovať že po spekaní na 1100°C je fázové zloženie všetkých vzoriek, s rastúcim množstvom SiO<sub>2</sub> takmer rovnaké. Pomer medzi α-TCP a β-TCP rastie so zvyšujúcou sa spekacou teplotou. Pri 1200 °C je tento pomer takmer 1:1. Vstupný prášok hydroxyapatit bol pri teplote 1100°C takmer celý (95%) rozložený na β-TCP. Pri teplote 1200°C sa TCP začal transformovať z romboedrickej mriežky (β-TCP) na monoklinickú (α-TCP). Pri vyššej teplote 1300 °C rastie aj percento α-TCP na cca 60 %. U vzoriek, ktoré na začiatku obsahovali 10 hm.% SiO<sub>2</sub> sa v štruktúre začína objavovať kryštalický SiO<sub>2</sub> vo forme kristobalitu a kremeňa, v menšom množstve než by odpovedalo počiatočnému stavu. Zbytok nebol RTG identifikovateľný, čo naznačuje, že zbytkový SiO<sub>2</sub> bol amorfnou fázou podobnou biosklu. Toto tvrdenie by si vyžadovalo ďalšie testovanie. Kristobalit sa objavuje pri 1100°C u 10 hm.% SiO<sub>2</sub> a s rastúcou spekacou teplotou a množstvom oxidu kremičitého má rastúci charakter. U nesubstituovaných kalcium fosfátoch sa kristobalit nenachádza. Difraktogramy v grafe č... ukazujú ako sa mení zloženie fázy na teplote u vzoriek s 1 hm. % SiO<sub>2</sub>.

množstvo  $\beta$ -fázy má rastúci charakter, kým množstvo zbytkového HA s teplotou klesá.

Tab. č. 2: Percentuálny podiel novovzniknutých fázy u jednotlivých vzoriek Graf. č... RTG difrakcia vzoriek s 1 hm.%  $\text{SiO}_2$  pri spekacích teplotách 1100°C, 1200°C

	Hm.% $\text{SiO}_2$	HA [%]	TCP [%]	Kryštalický $\text{SiO}_2$ [%]
1100°C	0	2	98	-
	0,1	3	97	-
	1	3	97	-
	10	2	96	2
1200°C	0	1	99	-
	0,1	2	98	-
	1	1	98	2
	10	0	89	11
1300°C	0	2	98	-
	0,1	2	95	3
	1	1	96	3
	10	0	88	12



Obr. 7. RTG difrakcia vzoriek s 1 hm.%  $\text{SiO}_2$  pri spekacích teplotách 1100 °C, 1200 °C a 1300 °C



V prípade, že je TCP substituovaný kremíkom [45], substituovaná je prednostne  $\alpha$  fáza. Dochádza k deformácii mriežky o čom môžu svedčiť zmenené mriežkové parametre. Výsledné hodnoty majú klesajúci charakter v závislosti na vzrastajúcom obsahu  $\text{SiO}_2$ . Mriežkové parametre boli stanovené pre  $\alpha$ -TCP. Prehľad nameraných mriežkových parametrov a, b, c a uhlu  $\beta$  je v tab...

Tab. 3: Mriežkové parametre pre vzorky spekané na 1200 °C určené pre  $\alpha$ -TCP.

	Hm.% $\text{SiO}_2$	Mriežkové parametre			
		a	b	c	B
1200°C	0,0	12,8656	9,1107	12,8670	107,4539
	0,1	12,8660	9,1100	12,8673	107,4718
	1,0	12,8600	9,1123	12,8659	107,4441
	10,0	12,843	9,1123	12,8560	107,3800

## Charakterizácia pripravených pien

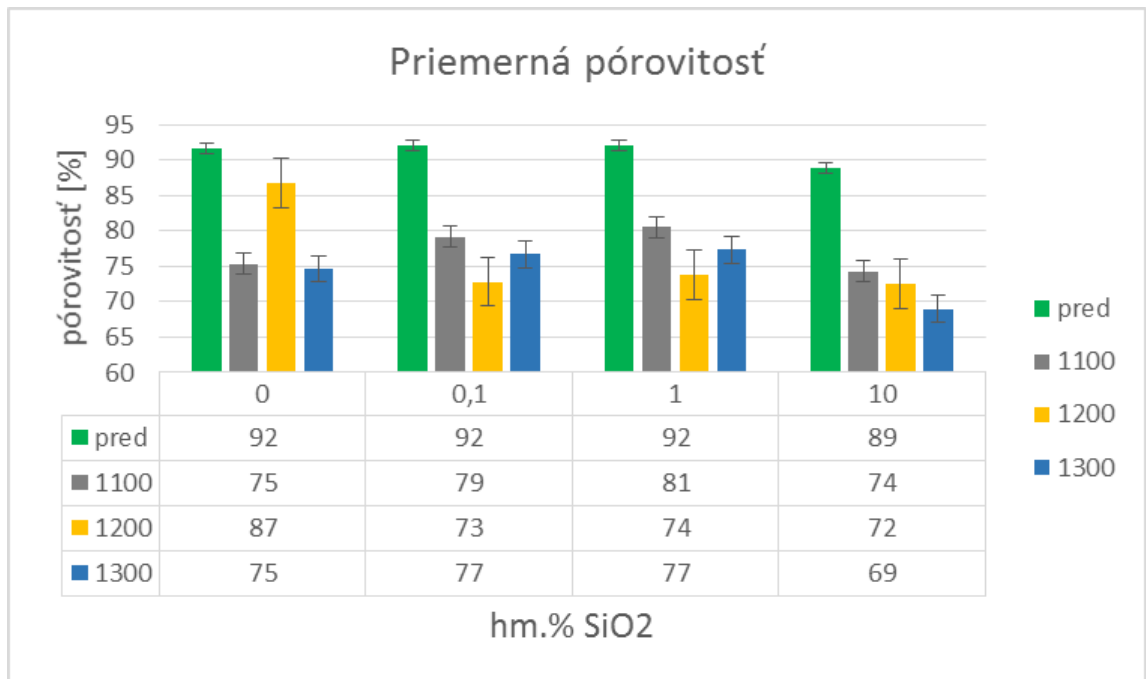
### Pórovitosť 3D pien

Celková pórovitosť u biokeramických 3D pien bola stanovená pomocou výpočtu z rovnice (1).

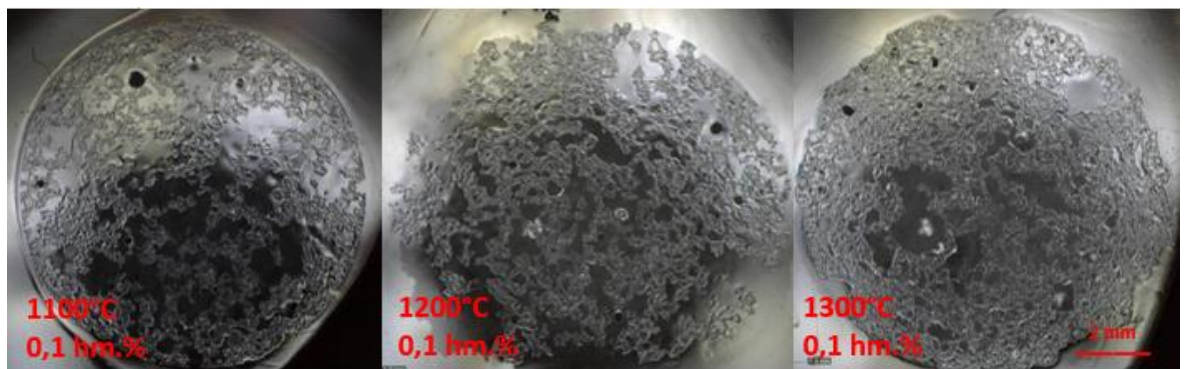
$$P_c = 100 * \left( 1 - \frac{\rho_v}{\rho_{mat}} \right) [\%] \quad (2)$$

kde  $\rho_v$  je objemová hmotnosť látky [ $\text{kg m}^{-3}$ ] a  $\rho_{mat}$  je hustota matrice [ $\text{kg m}^{-3}$ ].

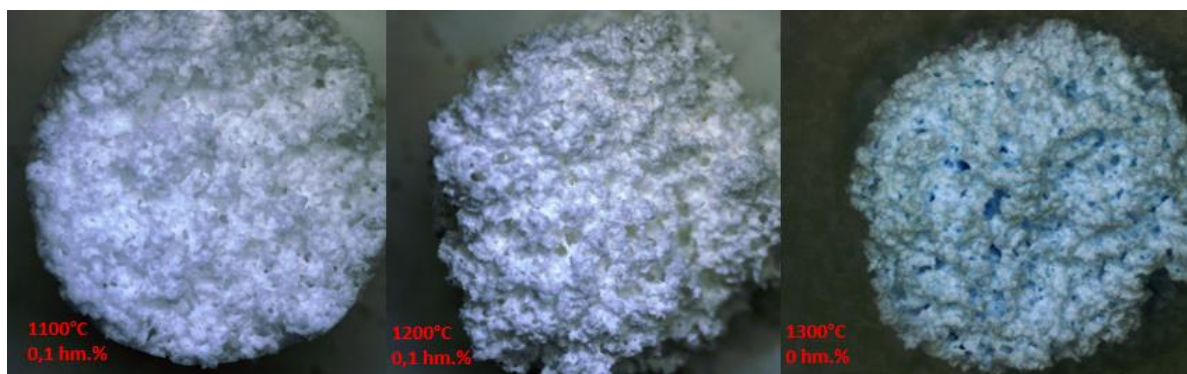
Pórovitosť pred spekaním bola vypočítaná z kompozitu HA/PU (polyuretán), kedy sa predpokladalo, že celý PU vyhorí. U vzoriek s obsahom 0; 0,1 a 1 hm%  $\text{SiO}_2$  je objem nepatrne vyšší ako u 10 hm.%, pretože systém vypenil menej. Kvôli tomu majú vzorky mierne odlišné vlastnosti. Meranie pórovitosti po spekaní vzoriek bolo viac menej orientačné. Po porovnaní so zmrštením priemerov meraných na diskových vzorkách vyplýva, že najväčšia zmena objemu nastala u vzoriek spekaných na 1200°C. Z výsledkov v grafe č.. je vidieť, že obsah pórov pred spekaním dosahuje hodnotu približne 90%. Po spekaní sa obsah pórov pohyboval v rozmedzí 70 – 85 %, okrem vzoriek s 10 hm.%, kde je pokles pórovitosti väčší, približne na 70 %. Chyba merania, môže byť spôsobená nepravidelným tvarom a odlupovaním častíc kryštálov pri manipulácii. Pevnosť pien sa zvýšila po spekaní. Aj napriek pomerne vysokej pórovitosti je celková manipulačná pevnosť dobrá, čo dokazuje, žeby mohli byť uplatniteľné v tkanivovom inžinierstve ako materiál na výrobu kostných náhrad. Obsah  $\text{SiO}_2$  nemal zásadný vplyv na výslednú pórovitosť. Na obr. 9, 10, 11 sú snímky zo stereolupy, kde vidieť prepojené makropóry u všetkých vzoriek. Priemerná veľkosť pórov pohybuje okolo 200 $\mu\text{m}$ . Podľa literatúry je mikropórovitosť najväčšia u spekacej teploty 1100°C, čo je vidieť na kompaktnejšej štruktúre vzorky na obr. č.. A.



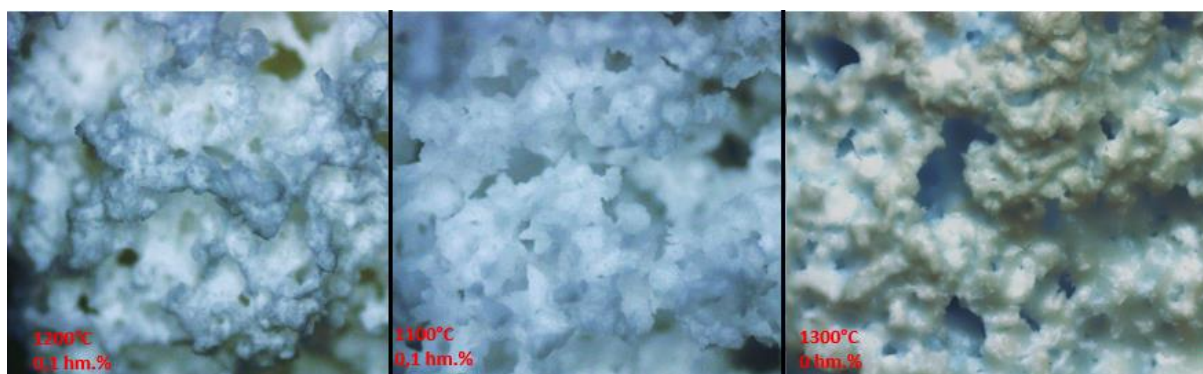
Obr. 8. Grafič priemernej percent pórovitosti u vzoriek pred spekaním a po spekaní na 1100°C, 1200°C a 1300°C.



Obr. 9. Snímky keramografických výbrusov zo stereolupy. Štruktúra 3D keramických pien s obsahom 0,1 hm.% SiO<sub>2</sub> pri spekacích teplotách 1100 °C, 1200 °C a 1300 °C



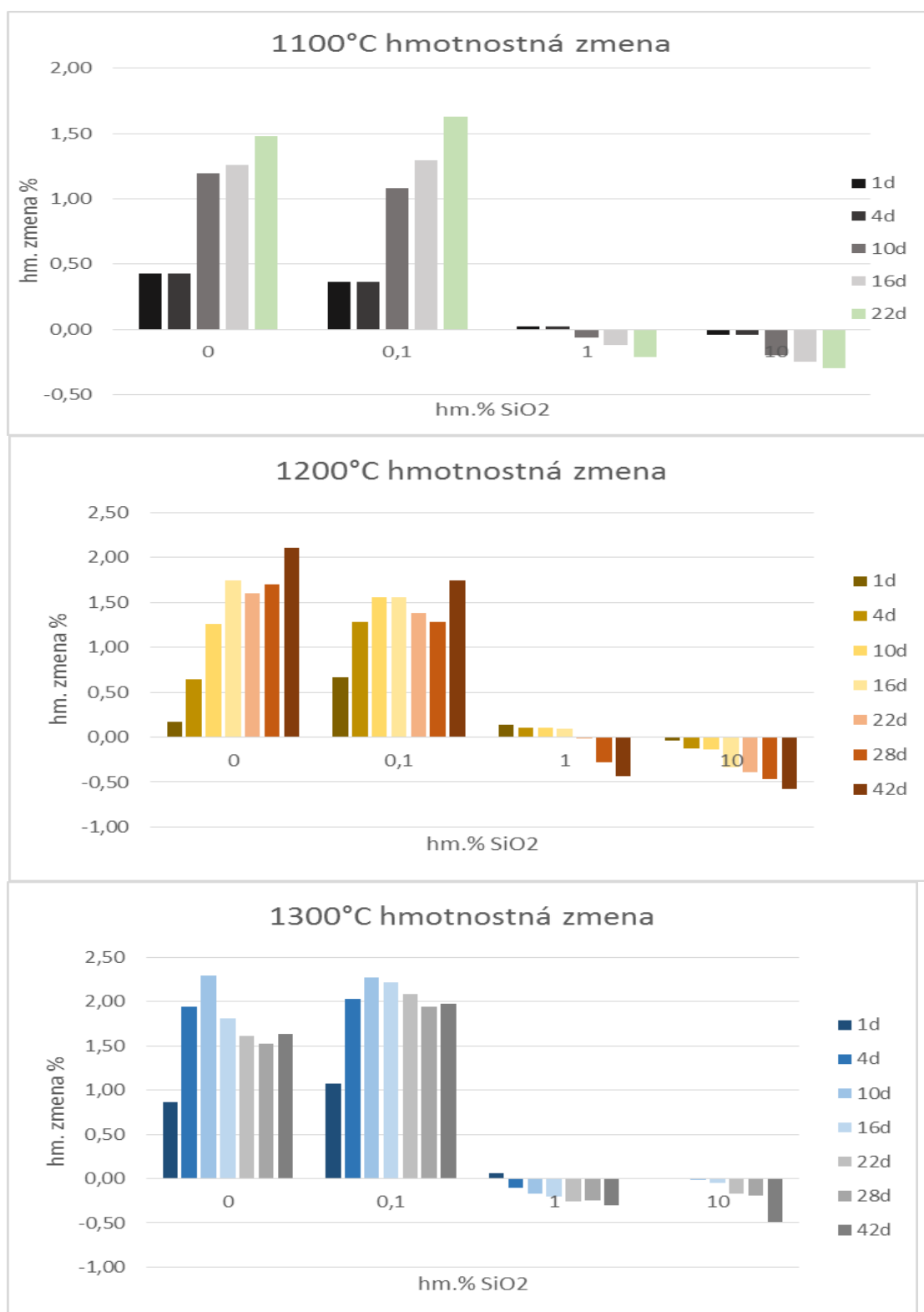
Obr. 10. Snímky HA zo stereolupy vzoriek s obsahom 0,1 hm.% spekané na 1100°C, 1200°C a 1300°C.



Obr. 11. Snímky HA zo stereolupy vzoriek s obsahom 0,1 hm.% spekané na 1100°C, 1200°C a 1300°C.

## Testovanie rozpustnosti v Tris-HCl

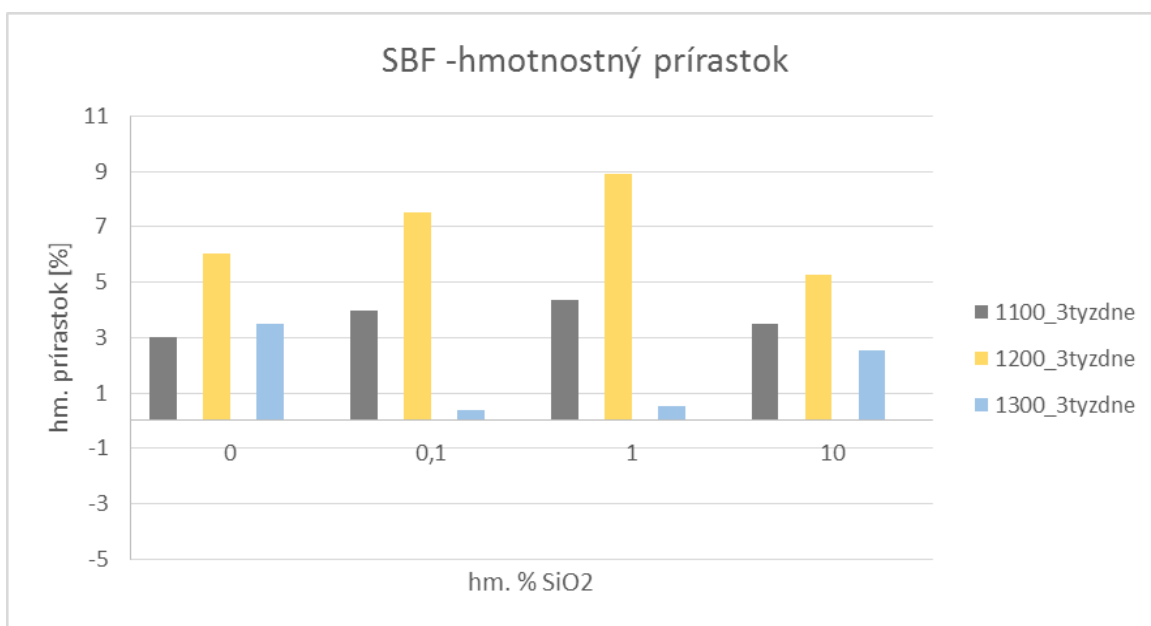
Rozpustnosť bola testovaná podľa normy ISO 10993-14 v roztoku Tris-HCl na tuhých diskových vzorkách [44]. V Tris pufri boli testované vzorky s hm.% SiO<sub>2</sub> 0; 0,1; 1 a 10, spekané na teploty 1100°C, 1200°C a 1300°C. Výsledky meraní a zmenu hmotností po 42 dňoch inkubácie v TRIS pufri možno pozorovať v grafe č... Z grafov je vidieť, že rozpustnosť má rovnaký trend u všetkých spekacích teplotách. Neočakávané hodnoty sa objavili u vzoriek s nulovým alebo zanedbateľným množstvom SiO<sub>2</sub>, kde nastal nárast hmotnosti. Po 22 dňoch bol vo všetkých prípadoch zaznamenaný nárast okolo 1,5 %. To, že je nárast nekonštantný je pravdepodobne spôsobené tým, že sa vzorky počas inkubácie otlačili o dno kultivačnej jamky, čo bolo pozorované počas výmeny telovej tekutiny. Tým bola odstránená novovzniknutá vrstva a preto hmotnosť skokovo poklesla. Hmotnosť vzoriek s koncentráciou 1 a 10 hm.% SiO<sub>2</sub> u všetkých spekacích teplôt klesala, tak ako sa podľa literatúry očakávalo. Je zaujímavé že prídavok len 1 hm.% mal veľký vplyv na chovanie vzorky, aj keď z výsledkov RTG analýzy boli fázy skoro rovnaké ako pri obsahu 0 a 0,1 hm.% SiO<sub>2</sub>. Závislosť úbytku na čase je v tomto prípade takmer lineárna (v uvedenom grafe sú nepravidelné časové úseky). Vzorky sa po 42 dňoch inkubácie rozpustili o približne 0,5%, nezávisle na množstve SiO<sub>2</sub>. Neexistuje však 100%-ný dôkaz, že sa všetok Si nachádzal v mriežke. Je možné, že vytvoril sekundárnu sklenú fázu čo potvrdzuje že kremíkom zlepšuje rozpustnosť kalcium fosfátov. Ďalšou zaujímavou oblasťou štúdie by mohlo byť testovanie vplyvu množstva použitej telovej tekutiny na rýchlosť v rozpustnosti. tomto prípade mohlo dôjsť v nasýtení Trisu iónmi príliš rýchlo, preto sa degradácia materiálu po presýtení zastavila. Experiment tejto práce skúmal rozpustnosť biochemicky bez prítomnosti živých buniek, preto by mohla táto reakcia prebiehať v ľudskom .



Obr. 12. Grafy postupných hmotnostných zmien vzoriek-diskov ponorených v TRIS pufri počas celého časového obdobia- 42 dní.

## SBF- testovanie bioaktivity

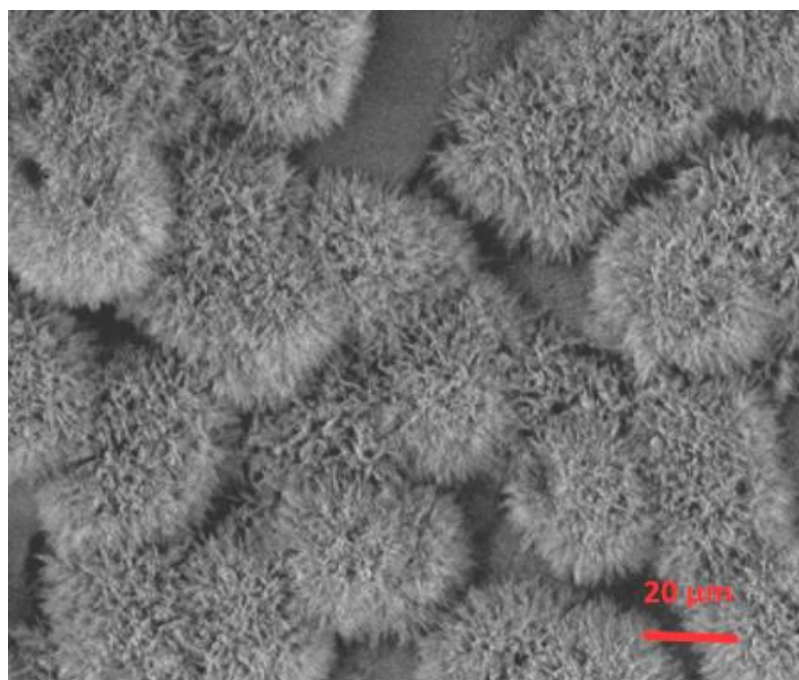
Pomocou simulovanej telovej tekutiny (SBF) bola testovaná bioaktivita kalcium fosfátov. Vzorky by mali byť schopné tvoriť väzbu s ľudskou kosťou a tento experiment má potvrdiť *in vivo* bioaktivitu pripravených vzoriek. SBF má koncentráciu iónov podobnú krvnej plazme ako je vidieť v tab. č. 1. Ako je z grafu na obr. 12 vidieť, hmotnosti narástli u všetkých vzoriek po 20-tich dňoch inkubácie. Najväčší nárast je pozorovaný u vzoriek spekaných na 1200°C. Množstvo vzniknutej fázy sa u vzoriek spekaných na 1100°C a 1200°C zvyšuje spolu s pribúdajúcim obsahom SiO<sub>2</sub> do cca 1% a potom je porovnateľné s nedopovanými vzorkami. Bioaktivita bola testovaná na poréznych penách, ktoré majú tendenciu lámať sa, čo mohlo mať negatívny vplyv na meranie. Výsledkom je, že sa všetky vzorky v telovej tekutine SBF chovali bioaktívne. Na obr. 13 je znázornená lamelárna štruktúra novovzniknutej fázy.



Obr. 13. Graf hmotnostného prírastoku na vzorkách skúmaných v SBF počas 2 týždňov.

	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	pH
SBF	142,0	5,0	1,5	2,5	148,8	4,2	1,0	0,5	7,4
HBP	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5	7,2-7,4

Tab. č 4: Iónová koncentrácia a pH SBF v porovnaní s HBP- krvná plazma



Obr. 14.  
1200°C

Ukážka novovzniknutej vrstvy apatitu na povrchu vzorky spekanej na

## 5 ZÁVER

Kremíkom substituované kalcium fosfátové biokeramické peny boli pripravené tuhofázovou reakciou komerčného prášku- Hydroxyapatit a oxidu kremičitého. Vlastnosti a štruktúru ovplyvňujú použité substitúcie, preto bol ako dopovací prvok použitý kremík. Vybrané obsahy použitého oxidu kremičitého boli 0 až 20 hm.%  $\text{SiO}_2$ . Keďže spekacia teplota tiež výrazne ovplyvňuje štruktúru a vlastnosti kalcium fosfátov, boli použité teploty 1100°C, 1200°C a 1300°C.

Základné požiadavky kladené na substituované kalcium fosfáty sú pórovitosť, dostatočné mechanické vlastnosti, bioaktivita a rozpustnosť. Po spekaní sa obsah pórov pohyboval okolo 70-80 %, nezávisle na obsahu  $\text{SiO}_2$ . Otvorená pórovitosť pien je dôležitá, pretože uľahčuje prenikanie živých buniek do náhrady, tým sa jednoduchšie vytvorí chemická väzba. Z testovania vyplýva, že obsah  $\text{SiO}_2$  nemal zásadnú vplyv na veľkosť a množstvo pórov.

Testovanie rozpustnosti prebiehalo pri 37°C po dobu 42 dní. Z testovania rozpustnosti v Tris pufri vyplýva, že dopovanie kremíkom má skutočne vplyv na rozpustnosť kalcium fosfátov. Pri celkovom obsahu 1 a 10 hm.%  $\text{SiO}_2$  sa vzorky rozpúšťali rýchlejšie ako pri nedopovanom stave. Pozorované boli kryštalické fázy HA,  $\alpha$ -TCP a  $\beta$ -TCP. Z difraktogramov pre jednotlivé spekacie teploty vyplýva, že pomer  $\alpha$ -TCP/ $\beta$ -TCP sa s rastúcou teplotou a obsahom kremíku zväčšuje. Pri obsahu kremíku 1 a 10 hm.% sa v štruktúre vylučuje kremík ako samostatná fáza- kristobalit. Bioaktivita vzoriek bola testovaná v telovej tekutine SBF. Iónové zloženie tekutiny podobné ľudskej plazme vytvorilo vhodné podmienky na tvorbu novej fázy na povrchu vzoriek. Po 14 dňoch testovania vznikla na povrchu nová vrstva apatitu.

Celkovo testovanie potvrdilo výhodu dopovania kalcium fosfátov. Práve substitúcia kremíkom zlepšila rozpustnosť a bioaktivitu, čo by mohlo byť v budúcnosti využívané v biomedicíne na tvorbu nových kostných náhrad. Štruktúra 3D pien podobná ľudskej kosti má dostatočnú pevnosť aby mohla byť použitá v tkanivovom inžinierstve a biomedicínskych aplikáciách.



# LITERATURA

- [1] Driessens F, Verbeeck R. Biomaterials. Boca Raton: CRC Press; 1990.
- [2] P.Ducheyne, K.Healy, D.E.Hutmacher, D.W.Grainger, C.J.Kirkpatrick (Eds.), Comprehensive Biomaterials. Six-Volume Set. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 2011, 3672pp.
- [3] ZEESHAN, Sheikh, Sima CORNELIU a Glogauer MICHAEL. Bone Replacement Materials and Techniques Used for Achieving Vertical Alveolar Bone Augmentation. Materials — Open Access Materials Science Journal [online]. 2015, 2015(8), 2953–2993 [cit. 2017-05-26]. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/journal/materials>
- [4] SUSMITA, Bose, Roy MANGAL a Amit BANDYOPADHYAY. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. Cell Press [online]. 2012, 2012(10), 546–554 [cit. 2017-05-26]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.07.005>
- [5] D.F. Williams, The Williams Dictionary of Biomaterials, Liverpool University Press, Liverpool, UK, 1999, p.368.
- [6] M. Šupová, Substituted hydroxyapatite for biomedical applications: a review, Ceram.Int 41 (2015) 9203–9231.
- [7] D.F. Williams, On the nature of biomaterials, Biomaterials 30 (2009) 5897–5909.
- [8] DOROZHKIN, Sergey V. Calcium orthophosphate bioceramics. Ceramics international [online]. 2015, 2015(41), 13913–13966 [cit. 2017-03-26]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272884215015291>
- [9] P.Ducheyne, K.Healy, D.E.Hutmacher, D.W.Grainger, C.J.Kirkpatrick (Eds.), Comprehensive Biomaterials. Six-Volume Set. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 2011, 3672pp.
- [10] Lu, M.Descamps, J.Dejou, G.Koubi, P.Hardouin, J.Lemaitre, J P. Proust, The biodegradation mechanism of calcium phosphate biomaterials in bone, J.Biomed. Mater. Res. Appl. Biomater 63 (2002) 408–412.
- [11] H. Wang, J.K.Lee, A.Moursi, J.J.Lannutti, Ca/P ratio effects on the degradation of hydroxyapatite in vitro, J.Biomed.Mater.Res.A 67A (2003) 599–608.
- [12] S. Bertazzo, W.F.Zambuzzi, D.D.P.Campos, T.L.Ogeda, C. V. Ferreira, C.A.Bertran, Hydroxyapatite surface solubility and effect on cell adhesion, Colloids Surf. B 78 (2010) 177–184.
- [13] D.C. Tancréd, B.A.McCormack, A.J.Carr, A synthetic bone implant macroscopically identical to cancellous bone, Biomaterials 19(1998) 2303–2311.
- [14] X. Miao, D.Sun, Graded, gradient porous biomaterials, Materials 3 (2010) 26–47.
- [15] Schwarz K, Epple M. Hierarchically structured polyglycolide—a biomaterial mimicking natural bone. Macromol Rapid Commun 1998;19(12):613–7.
- [16] Hulbert SF, Young FA, Mathews RS, Klawitter JJ, Talbert CD, Stelling FH. Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. J Biomed Mater Res 1970; 4(3):433–56.
- [17] Kuboki Y, Jin Q, Takita H. Geometry of carriers controlling phenotypic expression in BMP-induced osteogenesis and chondrogenesis. J Bone Joint Surg Am 2001;83A(Suppl. 1(Pt 2)): S105–15
- [18] K. Hing, B. Annaz, S. Saeed, P. Revell, T. Buckland, Microporosity enhances bioactivity of synthetic bone graft substitutes, J. Mater. Sci. Mater. Med. 16 (2005) 467–475.
- [19] R.Z. LeGeros, Calcium phosphate-based osteoinductive materials, Chem. Rev 108(2008) 4742–4753.

- [20] E. Munch, J. Franco, S. Deville, P. Hunger, E. Saiz, A. P. Tomsia, Porous ceramic scaffolds with complex architectures, *JOM* 60(2008)54–59.
- [21] W. L. Suchanek, M. Yoshimura, Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants, *J. Mater. Res.* 13(1998)94–117.
- [22] Y. Okanoue, M. Ikeuchi, R. Takemasa, T. Tani, T. Matsumoto, M. Sakamoto, M. Nakasu, Comparison of in vivo bioactivity and compressive strength of a novel superporous hydroxyapatite with beta-tricalcium phosphates, *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 132(2012) 1603–1610.
- [23] S. V. Dorozhkin, Calcium Orthophosphates: Applications in Nature, Biology, and Medicine, PanStanford, Singapore, 2012, p. 850.
- [24] A. C. Taş, F. Korkusuz, M. Timuçin, N. Akkaş, An investigation of the chemical synthesis and high-temperatures intermingling behaviour of calcium hydroxyapatite (HA) and tricalcium phosphate (TCP) bioceramics, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 8(1997)91–96.
- [25] J. S. V. Albuquerque, R. E. F. Q. Nogueira, T. D. P. da Silva, D. O. Lima, M. H. P. da Silva, Porous triphasic calcium phosphate bioceramics, *Key Eng. Mater.* 254–256 (2004) 1021–1024.
- [26] R. V. da Silva, C. A. Bertran, E. Y. Kawachi, J. A. Camilli, Repair of cranial bone defects with calcium phosphate ceramic implant or autogenous bone graft, *J. Craniofac. Surg.* 18(2007)281–286.
- [27] G. Daculsi, O. Laboux, O. Malard, P. Weiss, Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 14 (2003) 195–200.
- [28] S. V. Dorozhkin, Biphasic, triphasic and multiphasic calcium orthophosphates, *Acta Biomater.* 8(2012)963–977.
- [29] Dorozhkin S, Epple M. Biomineralization of calcium phosphates. *Angew Chem Int Ed* 2002;41:3130–46.
- [30] Mastrogiacoma M, Muraglia A, Komlev V, Peryin F, Rustichelli F, Crovace A, et al. Tissue engineering of bone: search for a better scaffold. *Orthod Craniofac Res* 2005;8:277–84.
- [31] Elliot J. Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. New York: Elsevier; 1994.
- [32] Landis WJ, Glimcher MJ. Electron diffraction and electron probe microanalysis of the mineral phase of bone tissue prepared by anhydrous techniques. *J Ultrastruct Res* 1978;63:188–223.
- [33] Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. New York: Academic Press; 2004.
- [34] Boivin G. The hydroxyapatite crystal: a closer look. *Medicographia* 2007;29: 126–32.
- [35] Shepherd JH, Shepherd DV, Best SM. Substituted hydroxyapatites for bone repair. *J Mater Sci Mater Med* 2012;23:2335–47.
- [36] Carlisle EM. Silicon: an essential element for the chick. *Science* 1972;178: 619–21.
- [37] Schwarz K. A bound form of silicon in glycosaminoglycans and polyuronides. *Proc Natl Acad Sci* 1973;70:1608–12. [27] Carlisle EM. In vivo requirement for silicon in articular cartilage and connective tissue formation in the chick. *J Nutr* 1976;106:478–84.
- [38] Jugdaohsingh R, Tucker KL, Qiao N, Cupples LA, Kiel DP, Powell JJ. Dietary silicon intake is positively associated with bone mineral density in men and premenopausal women of the Framingham Offspring cohort. *J Bone Min Res* 2004;19:297–307.
- [39] Hench LL. Bioceramics: from concept to clinic. *J Am Ceram Soc* 1991;74:1487–510.
- [40] Elliott JC, Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates. Amsterdam: Elsevier, 1994; 18.
- [41] Hench LL. The story of Bioglass. *J Mater Sci – Mater Med* 2006;17:967–78.
- [42] Jones JR. Review of bioactive glass: from Hench to hybrids. *Acta Biomater* 2013;9:4457–86.
- [43] Thomas MV, Puleo DA, Al-Sabbagh M. Bioactive glass three decades on. *J Long Term Eff Med Implants* 2005;15:585–97.

[44] ISO 10993-14. 2011. ČR: ČESKÁ TECHNICKÁ NORMA, 2014.

[45] A.M. Pietak, J.W.Reid, M.J.Stott, M.Sayer, Silicon substitution in the calcium phosphate bioceramics, *Biomaterials* 28 (2007) 4023–4032.

## ZOZNAM SKRATIEK

MDI- Ongronat® 2500 MDI (BorsodChem Zrt., Maďarsko). MDI je aromatický izokyanatán

Tris- Tris(hydroxymetyl) aminometán

TCP- Trikalciium fosfát

HA- Hydroxiapatit

CaP- Kalcium fosfát

## ZOZNAM OBRÁZKOV

- Obr. 1. Schematický náčrt procesov prebiehajúcich na povrchu hydroxyapatite (HA) po implantácii [8]
- Obr. 2. Schématické nákresy rôznych typov pórovitosti keramických materiálov. A- neporézny, B-mikropórovitosť, C- makropórovitosť (sférická), D- makropórovitosť (sférická) + mikropóry, D- makropórovitosť (3D-tlač) [8].
- Obr. 3. SEM fotografie kalcium fosfátovej biokeramiky zlinutej na A- 1500°C a B- 1200°C [8].
- Obr. 4. Röntgenové snímky zajačej kosti po implantácii CDHA po A- 4týždňoch, B- 12 týždňoch, C- 24 týždňoch a D- 72 týždňoch a po implantácii HA po A- 4týždňoch, B- 12 týždňoch, C- 24 týždňoch a D- 72 týždňoch [8].
- Obr. 5. Obr. č.: Snímka zfn Hydroxyapatitu. Priemerná veľkosť aglomerátov sa pohybuje v rozmedzí 8-13  $\mu\text{m}$ .
- Obr. 6. Náčrt teplotného cyklu pri spekaní vzoriek.
- Obr. 7. RTG difrakcia vzoriek s 1 hm.%  $\text{SiO}_2$  pri spekacích teplotách 1100 °C, 1200 °C a 1300 °C
- Obr. 8. Grah priemerných percent pórovitosti u vzoriek pred spekaním a po spekaní na 1100°C, 1200°C a 1300°C.
- Obr. 9. Snímky keramografických výbrusov zo stereolupy. Štruktúra 3D keramických pien s obsahom 0,1 hm.%  $\text{SiO}_2$  pri spekacích teplotách 1100 °C, 1200 °C a 1300 °C
- Obr. 10. Snímky HA zo stereolupy vzoriek s obsahom 0,1 hm.% spekané na 1100°C, 1200°C a 1300°C.

- Obr. 11. Snímky HA zo stereolupy vzoriek s obsahom 0,1 hm.% spekané na 1100°C, 1200°C a 1300°C.
- Obr. 12. Grafy postupných hmotnostných zmien vzoriek-diskov ponorených v TRIS pufri počas celého časového obdobia- 42 dní.
- Obr. 13. Graf hmotnostného prírastku na vzorkách skúmaných v SBF počas 2 týždňov.
- Obr. 14. Ukážka novovzniknutej vrstvy apatitu na povrchu vzorky spekanej na 1200°C

## ZOZNAM TABULIEK

Tab. 1.: Zoznam komerčne dostupných kalcium fosfátov. Prevzaté z [8].

Tab. 2.: Percentuálny podiel novovzniknutých fázy u jednotlivých vzoriek Graf. č... RTG difrakcia vzoriek s 1 hm.% SiO<sub>2</sub> pri spekacích teplotách 1100°C, 1200°C a 1300°C

Tab. 3.: Mriežkové parametre pre vzorky spekané na 1200 °C určené pre α-TCP.

Tab. č 4: Iónová koncentrácia a pH SBF v porovnaní s HBP- krvná plazma.

## ZOZNAM ROVNÍC

$$m(\text{iso})n_{\text{eq}}(\text{iso}) = [m(\text{H}_2\text{O}) n_{\text{eq}}(\text{H}_2\text{O}) + m(\text{poly}) n_{\text{eq}}(\text{poly})]i_{\text{NCO}} \quad (1)$$

$$P_c = 100 * \left( 1 - \frac{\rho_v}{\rho_{mat}} \right) [\%] \quad (2)$$

